

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM ZMĚNY REAKTIVAČNÍ ÚČINNOSTI A MOŽNOSTI  
PROSTUPU PŘES HEMATOENCEFALICKOU BARIÉRU PO  
ZAVEDENÍ FLUORU DO STRUKTURY OXIMOVÉHO  
REAKTIVÁTORU ACETYLCHOLINESTERASY**

Study of change of reactivation potency and also ability of  
penetration through the blood-brain barrier of newly prepared  
(fluorinated) acetylcholinesterase reactivator

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.  
Školitel specialista: PharmDr. Jana Žďárová Karasová

Hradec Králové 2010

Ing. Pavel Jurczyk

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Místo a datum:

Podpis:

Tato diplomová práce vznikla v laboratoři katedry toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové ve spolupráci s PharmDr. Janou Žďárovou Karasovou.

Chtěl bych poděkovat PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za odborné vedení, konzultace a čas, který věnovala mé práci. Chtěl bych též velmi poděkovat PharmDr. Janě Žďárové Karasové za pomoc při práci v laboratoři, ochotu a pomoc při realizaci mé diplomové práce.

Také bych rád poděkoval kolektivu katedry toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za příjemné pracovní prostředí.

# OBSAH

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	7
2. ÚVOD .....	9
3. CÍL PRÁCE .....	11
4. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
4.1. Charakteristika NPL .....	12
4.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti NPL .....	13
4.3. Brány vstupu NPL do organismu .....	15
4.4. Mechanismus účinku NPL .....	16
4.4.1. Cholinesterasy .....	17
4.4.2. Aktivní místo AChE .....	17
4.4.3. Fáze účinku NPL .....	19
4.5. Klinické příznaky akutní intoxikace NPL .....	21
4.6. Diagnóza otravy NPL .....	22
4.7. Terapie otravy NPL .....	24
4.7.1. Obecné zásady terapie .....	24
4.7.2. Anticholinergika .....	25
4.7.3. Reaktivátory AChE .....	26
5. MATERIÁL A METODIKA .....	29
5.1. Chemikálie .....	29
5.2. Zvířata .....	29
5.3. Roztoky pro biochemické stanovení .....	30
5.4. Substrát .....	30
5.5. Kalibrační roztok .....	31
5.6. Biochemické stanovení aktivity cholinesteras .....	31
5.7. <i>In vivo</i> experiment .....	32
5.8. Kalibrace .....	32
5.9. Princip metody .....	33
5.10. Statistické hodnocení výsledků .....	33
6. VÝSLEDKY .....	34
7. DISKUSE .....	40
8. ZÁVĚR .....	44

9. ABSTRAKT .....	45
10. ABSTRACT .....	46
11. POUŽITÁ LITERATURA .....	47

# 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AČR	armáda České republiky
ACh	acetylcholin
AChE; EC 3.1.1.7	acetylcholinesterasa
ATChJ	acetylthiocholin jodid
BuCh	butyrylcholin
BuChE; EC 3.1.1.8	butyrylcholinesterasa
BuTChJ	butyrylthiocholin jodid
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CNS	centrální nervový systém
DTNB	5,5`-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina
GIT	gastrointestinální systém
HCl	kyselina chlorovodíková
HEB	hematoencefalická bariéra
i.m.	intramuskulární aplikace
i.v.	intravenózní aplikace

LD <sub>50</sub>	dávka toxické látky, která způsobuje smrt u 50 % testované populace
NPL	nervově paralytická látka
OF	organofosforový
PNS	periferní nervový systém
Tris	tris-(hydroxymethyl)aminomethan



## 2. ÚVOD

Otázka zamoření životního prostředí chemickými škodlivinami se v poslední době opět dostává do popředí zájmu nejen vzhledem k ekologickým problémům, ale také protože havárie, nebo úmyslné zasažení chemických závodů či skladů s běžně vyráběnými látkami může mít účinky srovnatelné s použitím chemických zbraní.

Nervově paralytické látky (NPL) jsou jednou z největších hrozeb moderního světa. Tyto látky jsou charakteristické rychlým nástupem účinku, vysokou toxicitou a vysokou letalitou pro všechny teplokrevné organismy, včetně lidí.

Typickými zástupci této skupiny látek jsou např.: tabun, sarin, soman, VX látka a další. Tyto látky již byly zneužity v mnoha válečných konfliktech, jako např.: válka v Koreji, Indočíně, Iráku, Iránu apod. (Bajgar 2006).

Z chemického hlediska se jedná o organofosforové (OF) sloučeniny způsobující ireverzibilní inhibici životně důležitého enzymu acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7), který je nezbytný pro kontrolu přenosu nervových vzruchů. AChE rozkládá neurotransmitter acetylcholin (ACh) na cholinergních nervových zakončeních a brání tak nadměrné stimulaci cholinergních receptorů jak v centrálním nervovém systému (CNS) tak i v periferním nervovém systému (PNS). Množství tohoto enzymu v organismu je však velmi malé. Rychle se tedy vyčerpá a její syntéza *de novo* probíhá velice pomalu.

V současnosti existuje několik terapeutických přístupů v léčbě intoxikace OF sloučeninami, ale žádný z nich není univerzálně účinný vůči všem známým NPL, nebo proti všem jejich účinkům (Delfino et al. 2009).

V terapii otravy způsobené NPL se osvědčilo podání kombinace anticholinergika (nejčastěji atropin) které tlumí muskarinové projevy intoxikace NPL v důsledku nahromadění neurotransmiteru ACh v synaptické štěrbině a oximu (např. obidoxim), jenž je schopen reaktivovat, tedy znovuoobnovit aktivitu již inhibované AChE. AChE tak může znovu rozkládat nahromaděný ACh.

V současnosti se nejčastěji používají k terapii Alzheimerovy choroby léky nazývané jako tzv. kognitiva, jenž zlepšují pozornost a paměťové schopnosti především svými cholinomimetickými účinky. Tyto látky (rivastigmin, galantamin) zlepšují transmitterové funkce ACh inhibicí AChE, která ACh štěpí, čímž ho je v mozku relativní nedostatek (Lincová a Farghali 2007).

OF sloučeniny se v současnosti široce používají v zemědělství (jako pesticidy) především v zemích třetího světa. Tyto pesticidy jsou sice asi o dva řády méně toxické, než bojové NPL, ale i tak způsobují řadu otrav a úmrtí. Eyer odhaduje počet intoxikací OF pesticidy na více než 3 miliony za rok s počtem mrtvých a zraněných asi 300 tisíc za rok (Eyer 2003).

Se sarinem je spojen dosud největší teroristický útok, v němž bylo použito chemické látky. Došlo k tomu v roce 1994 v japonském městě Matsumoto a o rok později v tokijském metru. Při těchto teroristických akcích, zorganizovaných japonskou náboženskou sektou Óm Shinrikjó (nejvyšší pravda Óm), bylo intoxikováno více než 5 000 lidí, z nichž 12 zasažených zemřelo (Kassa 2003).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo porovnat reaktivační účinnost fluorovaného oximového reaktivátoru AChE K22836 s dalšími běžně používanými oximovými reaktivátory AChE (např.: HI-6, obidoxim, trimedoxim) a nově syntetizovaným oximem K203, což je nefluorovaný analog oximového reaktivátoru K22836. Dále jsme se snažili zjistit jeho terapeutické možnosti v CNS srovnáním se standardně používanými nefluorovanými oximovými reaktivátory AChE ve snaze nalézt účinnější antidotum, které by lépe pronikalo do CNS. Toto antidotum by mohlo sloužit především jako první pomoc příslušníkům AČR při zasažení NPL. Dále by mohlo být užitečné i např. pro pracovníky v zemědělství, kteří se dostávají do kontaktu s organofosforovými inhibitory, jako jsou např. (insekticidy, pesticidy) apod.

Jako modelovou otravnou látku jsme si zvolili tabun. Intoxikace způsobené tabunem jsou velmi obtížně léčitelné v důsledku výskytu volného elektronového páru umístěného na dimethylamidové skupině, jenž prakticky znemožňuje atak nukleofilních činidel (oximů) (Kassa a kol. 2008).

Experiment byl prováděn na potkanech, kterým byl intramuskulárně (i.m.) injekčně aplikován atropin v dávce 21 mg/kg v kombinaci s různými oximovými reaktivátory AChE v terapeutických dávkách, odpovídajících 5 % LD<sub>50</sub>. Po 5 minutách jim byl také i.m. aplikován tabun v dávce 1LD<sub>50</sub> (180 µg/kg).

Sledovali jsme účinnost této terapie (podle míry reaktivace inhibované AChE a butyrylcholinesterasy (BuChE, EC 3.1.1.8) v různých částech těla potkanů) standardní spektrofotometrickou metodou dle Ellmana (Ellman et al. 1961) za pomoci 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové) kyseliny (DTNB) modifikovaným postupem podle Bajgara (Bajgar 1972).

Naším cílem bylo zjistit, zda zavedení atomu fluoru do oximového relativně účinného reaktivátoru K203 zlepší jeho prostup do mozku, a tím zvýší jeho reaktivační účinnost v CNS oproti standardně používaným nefluorovaným oximovým reaktivátorům AChE při intoxikaci tabunem *in vivo*.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1. Charakteristika NPL

Jedná se o chemické sloučeniny s přímým účinkem na nervový systém – CNS i PNS, jehož činnost narušují (Kassa 2003).

Z chemického hlediska jde o organické sloučeniny fosforu, jenž ve své molekule obsahují fosforylovou ( $P=O$ ) nebo thiofosforylovou ( $P=S$ ) vazbu.

Vyznačují se vysokou toxicitou vůči savcům. Jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek. Vedle vysoké toxicity jsou charakteristické také rychlým nástupem účinku a průnikem do organismu všemi branami vstupu. Jejich syntéza je poměrně snadná i levná a jsou vojensky i teroristicky snadno zneužitelné (Patočka a kol. 2004).

Organické sloučeniny fosforu byly známy již od počátku 20. století. Německý chemik Gerhard Schrader (pracovník koncernu I. G. Farben) popsal v roce 1935 na základě vlastní zkušenosti významné toxické účinky u N,N-dimethylamidofosorylfluoridu při výzkumu nových insekticidů. Přitom bylo zjištěno, že tato snadno dostupná látka má velmi vysokou toxicitu pro člověka (Bajgar 2006).

Schraderův výzkum otevřel cestu k cílené syntéze vojensky použitelných OF sloučenin, známých podle svého mechanismu účinku též jako NPL. V jedné z prvních skupin látek se systémovými účinky obsahující deriváty alkylesterů N,N-dimethylamidofosforečné kyseliny byl i tabun, poprvé připravený Langem a Krügerovou 23.12.1936. Po zahájení poloprovozní výroby a ověření ve vojenských zařízeních byl postaven závod v Dyhernfurthu (nyní je tato lokalita na území Polska s názvem Brzeg Dólny), který fungoval od dubna 1942 do začátku roku 1945. Podle různých pramenů bylo vyrobeno až 30 000 tun tabunu, z čehož bylo údajně 12 000 – 15 000 tun naplněno do munice (Bajgar 2006).

V roce 1939 byl syntetizován sarin, pojmenovaný podle svých objevitelů (Schrader, Ambros, Ritter a Linde). Koncem 2. světové války připravil R. Kun pinakolylový analog sarinu – soman, podstatně jedovatější než sarin. V této

době britská skupina B. C. Launderse z Cambridgské Univerzity připravila diisopropylfluorofosfát (Bajgar 2006).

Na německý výzkum vědci po válce navázali v USA, kde byla v letech 1961 – 1968 v Newportském vojenském závodě ve státě Indiana vyráběna látka VX (Bajgar 2006).

Sloučeniny stejné základní struktury se používají v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, zpomalovače hoření u elektrických zařízení, ve veterinární medicíně jako antiparazitika, či v humánní medicíně jako léčiva či jako sloučeniny k výzkumu nervových funkcí (Gupta 2006).

Nejvíce se tyto látky používají v zemědělství jako insekticidy (látky k hubení hmyzu). Jsou sice méně toxické, než bojové NPL v důsledku strukturálních rozdílů u receptorů AChE u hmyzu a savců, ale mohou vést k podobným smrtícím účinkům, pokud se použijí ve velkých množstvích, nebo ve vyšších koncentracích (Worek et al. 2004).

K otravám s následným úmrtím pak většinou dochází při špatné manipulaci, nebo při sebevražedných pokusech.

## 4.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti NPL

NPL dělíme na dvě velké skupiny, které jsou obecně označovány jako G látky a V látky.

### G látky:

Patří mezi ně: **tabun** (**GA** – O-ethylmethylamidokyanofosfát), **sarin** (**GB** – O-isopropylmethylfluorofosfonát), **cyklosarin** (**GF** – cyklohexylmethylfluorofosfonát) a **soman** (**GD** – O-pinakolylmethylfluorofosfonát).

Jsou to bezbarvé kapaliny při pokojové teplotě podobné vodě bez výraznějšího zápachu, relativně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Jejich teplota varu se pohybuje v rozmezí od 158°C (sarin) do 298°C (VX). Jsou relativně těkavé, a proto u nich hrozí vysoké riziko intoxikace prostřednictvím inhalace jejich par (Sidell et al. 1997).

Střední letální koncentrace v ovzduší vedoucí po 1 minutové expozici ke smrti 50 % exponovaných nechráněných osob se pohybuje mezi 0,03 a 0,08

mg.l<sup>-1</sup>. Střední smrtelná dávka při zamoření nechráněné kůže se pohybuje mezi 0,7 až 7 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti exponovaného jedince. V terénu vydrží bez ztráty toxicity 12-24 hodin (Patočka a kol. 2004).

#### V látky:

Patří mezi ně látka **VX** (O-ethyl-S-/2-diisopropyl-aminoethyl/-methylthiofosfonát). V chemicky čistém stavu bezbarvá, méně pohyblivá kapalina bez výraznějšího zápachu. VX látka je velmi málo těkavá, takže vydrží ve vodě a v terénu velmi dlouhou dobu (týdny až měsíce), než dojde k jejímu kompletnímu rozptýlení. U této látky tedy hrozí malé riziko inhalace, ale větší riziko při absorpci přes kůži (Sidell et al. 1997).

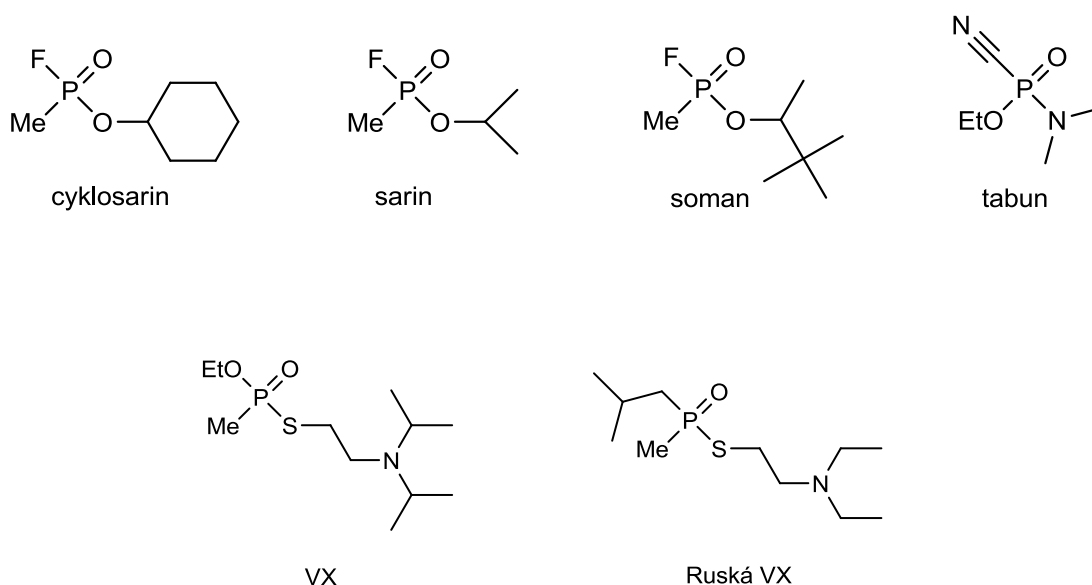
Ve vodě je špatně rozpustná, zato v organických rozpouštědlech a tucích je rozpustná velmi dobře. Střední letální koncentrace aerosolu VX látky v ovzduší vedoucí po 1 minutové expozici ke smrti 50 % exponovaných nechráněných osob se pohybuje kolem 0,036 mg.l<sup>-1</sup>. Střední smrtelná dávka při zamoření nechráněné kůže se pohybuje kolem 0,07 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti exponovaného jedince (Patočka a kol. 2004).

Podobné vlastnosti má látka **VR** (O-iso-butyl-S-(2-diethylaminoethyl)-methylthiofosfonát), což je Ruský analog látky VX vyvinutý na území tehdejšího SSSR. Další látky této skupiny jsou např.: CVX (čínský analog VX), VE, VG a VM (Marrrs et al. 2007).

Mezi NPL řadíme také látku GP. V literatuře je někdy uváděna pod zkratkou **GV**. Svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi se příliš neliší od ostatních NPL. Svým chemickým složením se pohybuje mezi G a V látkami [dimethylamido-O-(2-dimethylamino-ethyl)-fluorofosfonát].

Jde o látku se střední těkavostí. Nebezpečné jsou všechny brány vstupu. Její střední smrtelná dávka při zamoření nechráněné kůže se pohybuje kolem 1,36 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti exponovaného jedince (Patočka a kol. 2004).

V terénu vydrží déle než G látky (dny), ale není tak stálá jako VX. Její těkavost je vyšší než u VX látky, ale nižší než u G látek. Chemickou strukturu některých NPL znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1. Chemická struktura vybraných NPL.

Všechny NPL existují jako optické izomery. Tabun, sarin, cyklosarin, VX a VR mají 1 chirální fosforový atom, zatímco soman má ještě druhé centrum chiralit na uhlíkovém atomu pinakolylové skupiny. Tyto stereoizomery interagují s AChE různě. Díky tomu mají jednotlivé stereoizomery odlišné toxikologické vlastnosti. Jednotlivé nespecifikované směsi stereoizomerů každé NPL tak nemusí mít přesně definovatelné vlastnosti (Benschop a De Jong 1988).

### 4.3. Brány vstupu NPL do organismu

Pronikání NPL do organismu umožňuje koncentrační rozdíl NPL uvnitř organismu a ve vnějším prostředí. Organismus je od vnějšího prostředí oddělen bariérou, která je po stránce morfologické i funkční značně diferencovaná. Výsledné množství NPL které do organismu pronikne tak závisí na formě dané látky a místu, kterým tato NPL do organismu proniká.

Poškození organismu prostřednictvím NPL může být způsobeno těmito mechanismy:

- Zasažení dýchacích orgánů (inhalace), kdy NPL pronikají do plic ve formě par a jemných aerosolů.
- Průnik přes poškozenou kůži následkem odření, poranění, popálení a poleptání.
- Zasažení (kontaminace) neporušené kůže.
- Zasažení (kontaminace) oční spojivky.
- Zasažení zažívacích orgánů (ingesce) po požití zamořených potravin nebo vypití zamořené vody (perorální otrava).
- Zasažení jiných orgánů lymfatického a krevního systému po kontaktu se zamořenou technikou a materiálem, při poranění střepinami chemické munice (parenterální intoxikace).

Brána vstupu NPL do organismu ovlivňuje distribuci a metabolismus NPL. Má vliv na rychlost jejich absorpce, zasažení životně důležitých orgánů, na způsob a rychlost detoxikace NPL v organismu apod. (Patočka a kol. 2004).

#### **4.4. Mechanismus účinku NPL**

NPL ovlivňují cholinergní přenos nervového vzruchu, který je na synapsi zprostředkován chemickou látkou (neuromediátorem) ACh, jenž pracuje jako kationický neurotransmitter. ACh je syntetizován z exogenně dodávaného cholinu (potravou), který je acetylován pomocí acetyltransferasy. ACh je uvolněn z presynaptického nervu jako odpověď na akční potenciál. Difunduje přes synapsi, naváže se na ACh receptor. Navázáním se změní konformace (prostorové uspořádání) ACh receptoru a membrána se stane propustná pro  $K^+$  ionty, které začnou proudit do buňky a vzniklý elektrický potenciál se dál šíří po nervovém vlákne jako elektrický impuls k další synapsi. Neuromediátor musí být ihned po navázání na receptor a ukončení přenosu nervového vzruchu rozložen. Chemický rozklad neuromediátoru probíhá prostřednictvím katalytického působení enzymu AChE. Po rozložení ACh se receptor vrací do původního stavu (Patočka a kol. 2004, Quinn 1987).



#### **4.4.1. Cholinesterasy**

AChE i BuChE patří mezi cholinesterasy. AChE je selektivní vůči ACh, protože hydrolyzuje ACh rychle, zatímco BuChE jej hydrolyzuje pomalu. Fyziologická funkce AChE je dobře známa. Působí především na cholinergních receptorech v CNS i PNS a má důležitou roli při procesu přenosu nervových impulsů, neboť rozkládá ACh. BuChE je známá jako plasmatická cholinesterasa nebo pseudocholinesterasa. Je neselektivní. Je vyráběna játry a nachází se především v plasmě. Fyziologická funkce BuChE není ještě plně objasněna. Pravděpodobně participuje na základních stupních vývoje nervového systému (Vellom et al. 1993).

#### **4.4.2. Aktivní místo AChE**

Aktivní místo AChE je tvořeno katalytickou triádou obsahující: serin, glutamovou kyselinu a histidin. Tato triáda je podobná u dalších serinových hydrolas a proteas, kde je aspartát místo glutamové kyseliny (Sussman et al. 1991).

Katalytická triáda je umístěna na dně hluboké a úzké prohlubně enzymu AChE. Na stěně prohlubně jsou aromatické zbytky aminokyselin (tryptofan, glutamová kyselina a phenylalanin), jenž interagují s kvarterními amoniovými ionty (tzv. cholinové vazebné místo) (Ordentlich et al. 2004).

Velký dipólový moment v aktivním místě AChE vede k její vysoké katalytické účinnosti. Její obrat převyšuje  $10^4 \cdot s^{-1}$ . Difúze ACh k aktivnímu místu AChE je tedy stupněm limitu míry tohoto procesu (Quinn, 1987).

Mechanismus reakce zahrnuje nukleofilní atak serinu katalytické triády AChE fosforovým atomem OF sloučeniny. Na rozdíl od acetylované AChE, která se rychle sama regeneruje uvolněním octové kyseliny, je fosforylovaná AChE stabilní. Po fosforylaci aktivního místa AChE je tento enzym ireversibilně inhibován. Serin katalytické triády tak nemůže dále hydrolyzovat ACh (Marrs et al. 2007, Worek et al. 2004).

Počítačové studie fosforylace AChE sarinem prokázala, že reakce ve skutečnosti zahrnuje 2-stupňový adičně-eliminační mechanismus. Adice však určuje rychlost vazby inhibitoru na nativní AChE (Wang et al. 2008).

OF sloučeniny inhibují BuChE podobným mechanismem. Efekty této inhibice v organismu jsou však neznámé, protože ani fyziologická funkce BuChE není ještě zcela známá. OF sloučeniny se také kovalentně váží na další serinové esterasy, jako karboxylesterasa, neuropatická cílová esterasa, trypsin a chymotrypsin (Worek et al. 2005).

Vazba NPL na esterasy nevyvolává na rozdíl od inhibice AChE žádné klinické příznaky intoxikace, takže tyto esterasy působí jako „vychytávači“ (scavengery) NPL. Tyto látky na sebe váží část dávky NPL, která vstoupila do vnitřního prostředí intoxikovaného organismu. Je to velmi důležitý děj, protože se předpokládá, že pouze malá část z celkové dávky NPL se dostane na místo toxického účinku (AChE na cholinergních synapsích CNS a PNS (Patočka a kol. 2004, Bajgar a kol. 1991a).

Reakce OF sloučeniny s AChE zahrnuje zformování Michaelisova komplexu OF inhibitor-AChE. OF sloučenina se naváže na atom kyslíku katalytické triády serinu a AChE je tak inaktivována.

Spontánní znovuoobnovení aktivity (reaktivace), tzn. hydrolýza fosforylované AChE spočívající v eliminaci OF sloučeniny probíhá velice pomalu, stejně jako syntéza AChE *de novo*. Reaktivaci inhibované AChE můžeme urychlit pomocí reaktivátorů, což jsou z chemického hlediska nukleofilní sloučeniny (Marrs et al. 2007).

Jejich účinek však závisí na rychlosti procesu nazývaného stárnutí (dealkylace). U fosforylované AChE dojde ke zlomu mezi uhlíkovým atomem a kyslíkovým atomem navázaným na fosforový atom OF sloučeniny (v případě tabunu ke zlomu vazby mezi fosforem a dusíkem) s následným odštěpením alkylu (v případě tabunu dimethylaminové skupiny). Inhibovaná AChE po této reakci nemůže být účinně reaktivována spontánně, nebo působením nukleofilních činidel. Nelze ji poté reaktivovat. Je v tzv. nereaktivovatelné formě (Marrs et al. 2007).

Rychlost dealkylace inhibované AChE závisí na době kontaktu enzymu s NPL a na chemické struktuře inhibitoru. Z NPL nejrychleji dealkyluje AChE inhibovaná somanem (poločas dealkylace je přibližně 10 minut), AChE

inhibovaná sarinem dealkyluje pomaleji (poločas dealkylace je asi 3 hodiny). AChE inhibovaná tabunem má poločas dealkylace asi 19 hodin, zatímco u látky VX je proces dealkylace nejpomalejší (poločas dealkylace je přibližně 1,5 dne). Tento fakt významně ovlivňuje efekt léčby intoxikací těmito látkami (Worek et al. 2005).

#### **4.4.3. Fáze účinku NPL**

Po vstupu NPL do organismu zde probíhají čtyři hlavní fáze účinku NPL: resorpce, transport, metabolizace a vlastní toxický efekt.

Vlastní toxický efekt je realizován jen zlomkem podané dávky NPL (podle druhu látky 1 – 50 %). Při expozici NPL je kromě i.v. podání pozorováno zpoždění, které je způsobeno průnikem NPL biologickými bariérami.

Krevním oběhem je NPL zanesena na místo metabolického a toxického účinku.

Před dosažením cílové AChE mohou být OF sloučeniny v těle až několikrát biotransformovány. Většina OF sloučenin (pesticidy a další sloučeniny, ale nejde o NPL) nevykazuje žádnou, nebo jen malou anticholinesterasovou aktivitu jednotlivých nemetabolických forem. Biotransformace netoxických OF sloučenin na aktivní metabolity se děje např. změnou thiofosforylové vazby na fosforylovou. Tímto způsobem fosfthioláty a fosfodithioláty, jenž jsou obvykle slabé AChE inhibitory (díky nízké elektronegativitě síry ve srovnání s kyslíkem) jsou přeměněny na své oxidované formy, jenž jsou extrémně toxické anticholinesterasové sloučeniny. Jde o tzv. „letální syntézu“. (Jokanovic 2001).

Další důležité metabolické reakce jsou ty, jenž vedou k detoxikaci OF sloučenin. Tyto procesy zahrnují zlom jedné fosforové vazby za tvorby negativně nabitě molekuly, nebo zvýšení rozpustnosti OF sloučenin ve vodě, dělající jejich vylučování snadnější a snižující jejich poločas v organismu (Tang et al. 2006).

Většina NPL má relativně krátký poločas působení. NPL jsou rychle degradovány nebo rozptýleny na neletální koncentrace (Cannard 2006).

U NPL byly pozorovány i účinky nesouvisející přímo se zásahem do cholinergního přenosu nervového vzruchu, označované jako nespecifické nebo

necholinergní. Dlouhodobé účinky, pozorovatelné týdny až měsíce byly zaznamenány po trvalé expozici nízkých dávek NPL, nebo pozdním efektům akutní expozice těmito látkami (Rafai et al. 2007).

Nespecifické účinky NPL se obvykle manifestují později. Mezi nejvýznamnější nespecifické účinky NPL patří účinek charakterizovaný:

- obecnou stresogenní reakcí,
- zásah do metabolismu nukleových kyselin a bílkovin vedoucí až k mutagennímu efektu,
- ovlivnění imunity,
- hepatotoxický efekt,
- zásah do vodního a minerálního metabolismu,
- zásah do ledvinných funkcí.

Významný je i podíl nespecifických účinků NPL, vedoucích k morfologickému poškození nervové tkáně. Jde o velmi závažné důsledky akutní intoxikace NPL. Bezprostřední příčinou poškození neuronů po akutní intoxikaci NPL se jeví nadměrné vyplavení glutamátu v důsledku stimulace glutamátergních neuronů, tzv. receptorů N-methyl-D-aspartátu (NMDA receptory). Aktivace NMDA receptorů vede k nadměrné akumulaci vápníku uvnitř neuronů a následné neuronální smrti. V důsledku morfologického poškození některých oblastí mozku zůstávají po akutní intoxikaci NPL dlouhodobé neurologické následky, které mohou být patrné i několik let po akutní expozici NPL (Patočka a kol. 2004).

NPL inhibují také jiné enzymy než AChE. Extrémně zvýšené koncentrace inhibitorů cholinesteras mohou způsobit přímé účinky na cholinergní receptory bloádou iontových kanálů. NPL mohou ovlivnit také další neurotransmisní cesty, jako dopaminergní a noradrenergí (Marrs et al. 2007).

Nedávná studie matematicky modelovala smrtící účinek několika vysoce toxických OF sloučenin užitých jako NPL. Bylo zjištěno, že primárním mechanismem účinku je opravdu inhibice AChE. Méně než 10% jejich toxicity může být přisuzováno alternativním mechanismům účinku (Maxwell et al. 2006).

## 4.5. Klinické příznaky akutní intoxikace NPL

Klinickým důsledkem nadměrného dráždění cholinergních receptorů jsou v závislosti na jejich lokalizaci a typu: muskarinové, nikotinové a centrální klinické příznaky, které jsou charakteristické pro akutní fázi intoxikace. Souboru klinických příznaků intoxikace NPL v důsledku nadměrného dráždění cholinergních receptorů se také říká akutní cholinergní krize (Patočka a kol. 2004).

- Muskarinové příznaky.

Projeví se při nadměrné stimulaci muskarinových receptorů umístěných na efektorových orgánech.

Intoxikace se projeví zúžením zornic (mióza), na ciliárním svalu (porucha akomodace), ve spojivkách a nosní sliznici (překrvení a otok), na slinných, slzných a potních žlázách (zvýšené slinění, slzení a pocení), na sliznici a hladké svalovině dýchacích cest (zvýšená sekrece bronchiálních žlázek, zúžení bronchů), na hladké svalovině trávicího traktu a močového měchýře (zvýšená střevní peristaltika, bolesti až kolikovitého charakteru). Na srdci je v důsledku zvýšeného tonu parasymptiku pozorována bradykardie a pokles krevního tlaku.

- Nikotinové příznaky.

Projeví se při nadměrné stimulaci nikotinových receptorů umístěných v autonomních gangliích a na neuromuskulárních spojích.

Jsou způsobené zvýšenou koncentrací ACh na nikotinových receptorech na nervosvalových ploténkách a sympatických gangliích, jsou charakterizovány svalovou ochablostí, třesem a záškuby jednotlivých příčně pruhovaných svalů, postupně se rozšiřující na všechny kosterní svaly těla. Svalové fascikulace brzy přecházejí v intenzivní tonicko-klonické křeče, které mohou vyústit až v ochrnutí (paralýzu) kosterního svalstva. Tento stav je obzvláště nebezpečný především v případě paralýzy dýchacího svalstva a následného výrazného omezení dýchání.

- Centrální příznaky.

Jsou charakterizovány depresemi dechových a kardiovaskulárních center v oblasti prodloužené míchy, bolestmi hlavy, úzkostí, nadměrnou emoční labilitou, napětím, neklidem, závratěmi, depresivními stavy, zmateností, poruchami hybnosti a nezřídka i bezvědomím. Bezprostřední příčinou smrti v případě těžkých až smrtelných intoxikací bývá akutní respirační insuficience daná poruchou funkce dechových center a paralýzou dýchacích svalů včetně bránice. Těžká dechová nedostatečnost postupně vede k zástavě dechu s následnou zástavou srdce.

V případě překonání akutní cholinergní krize je klinický obraz těžké akutní intoxikace NPL charakterizován celkovým metabolickým rozvratem především v důsledku dlouhodobé hypoxie a acidózy. Celé měsíce po akutní těžké intoxikaci NPL mohou přetrvávat především neurologické a neuropsychické příznaky, mezi nimiž dominují zvýšená únava, poruchy spánku, emoční labilita, úzkostné až depresivní stavy a především poruchy paměti, učení a koncentrace (Patočka a kol. 2004).

Specifickou komplikací otrav NPL může být remise otravy daná buď vyplavením NPL z depotních míst (zvláště u somanu), nebo uvolněním NPL z vazby na bílkoviny krevní plasmy.

#### **4.6. Diagnóza otravy NPL**

V místě vstupu NPL tkáň nedráždí a bezprostředně většinou nevyvolávají ani nepříjemné subjektivní pocity. Ze subjektivních pocitů bývá prakticky vždy přítomný pocit tíže na hrudi, bolest hlavy, neklid a úzkost, velmi často nauzea. Z objektivních příznaků je u intoxikace NPL (zejména látek řady G) pozorována mióza, zvýšená sekrece a snížení aktivity krevních cholinesteras (Bajgar a kol. 1991a).

Velmi důležité je také sledovat hromadný výskyt podobných případů intoxikace v určité oblasti. V diferenciální diagnóze je nutno myslet na vyloučení tetanie, epilepsie a otravy kyanovodíkem či ostatními křečovými jedy. Diagnózu nám potvrdí laboratorní vyšetření snížené aktivity krevních cholinesteras

(plasmatické BuChE či erytrocytární AChE). Z nespecifických laboratorních vyšetření je možné uvést leukocytózu a zvýšenou aktivitu jaterních aminotransferas. Definitivní potvrzení diagnózy ukáží specializovaná vyšetření (test reaktivovatelnosti inhibovaných cholinesteras v krvi (odliší otravu NPL od otravy karbamáty), volná NPL či metabolity v krvi) (Bajgar a kol. 1991a, Patočka a kol. 2004).

Aktivita AChE či BuChE má zásadní význam pro stanovení diagnózy při otravě inhibitory cholinesteras. Aktivita těchto enzymů v krvi poměrně přesně odráží stupeň expozice organismu NPL. Stanovení aktivity AChE v erytrocytech nebo v celé krvi má pro diagnostiku otrav NPL větší význam než stanovení aktivity BuChE v plazmě nebo v séru.

Stupeň aktivity AChE v krvi lze považovat za indikátor poškození organismu při otravě organofosfáty. Snížení aktivity na:

- 70 % normálních hodnot je pozorováno u latentní otravy. Nevvolává žádné zřetelně viditelné symptomy intoxikace.
- 50 – 70 % normálních hodnot je u lehké formy otravy. Intoxikace organismu je doprovázena muskarinovými příznaky, jako např.: mióza, zvýšené slzení, zvýšené slinění a nebo zvýšená střevní peristaltika.
- 10 – 30 % normálních hodnot se vyskytuje u středně těžké otravy. Typickými příznaky jsou např.: svalová ochablost, třes, záškuby jednotlivých příčně pruhovaných svalů, zmatenost až bezvědomí apod.
- 0 – 10 % normálních hodnot indikuje těžké poškození organismu. Toto poškození končí ve většině případů úmrtím intoxikované osoby (Moretto 1998).

Návrat k normálním hodnotám při neléčené otravě (syntézou enzymu *de novo*) se u AChE erytrocytů pohybuje kolem 3 % na den, u BuChE je poněkud rychlejší a závisí na funkční schopnosti jaterního parenchymu (Bajgar a kol. 1991a).

Stupeň dealkylace inhibované AChE je možno zjistit tzv. testem reaktivovatelnosti. Principem metody je dvojí stanovení aktivity AChE v jednom materiálu, přičemž druhé stanovení je provedeno v přítomnosti reaktivátoru cholinesterasy. Jestliže je aktivita v druhém vzorku stejná nebo dokonce nižší, došlo již k vzniku kovalentní vazby mezi AChE a inhibitorem. Jestliže je však

nově zaznamenaná aktivita v přítomnosti reaktivátoru vyšší, znamená to, že AChE je možno reaktivovat.

Tento test je důležitý, protože může být doporučeno opakované podání reaktivátoru (autoinjektor). Pokud je již enzym v nereaktivovatelném stavu, není podání reaktivátoru účinné (Bajgar a kol. 1991a).

## **4.7. Terapie otravy NPL**

### **4.7.1. Obecné zásady terapie**

Při léčbě jedinců intoxikovaných NPL postupujeme obdobně, jako při otravě jakoukoli jinou toxickou látkou.

Především musíme vynést, nebo vyvézt intoxikovanou osobu ze zasažené oblasti. Také musíme trvale kontrolovat životní funkce postižené osoby, tzn. začít a udržovat vhodnou ventilaci pomocí některého z křísících přístrojů, případně doplnit umělé dýchání oxygenoterapií a regulovat vznikající acidózu (pomocí infuze s bikarbonátem sodným). Musíme také sledovat a udržovat pravidelnou činnost srdce postiženého (Kassa 2003).

Neprodleně také podáváme vhodná antidota (anticholinergika a reaktivátory AChE) tyto léčiva jsou aplikována intramuskulárně (i.m.) pomocí autoinjektoru do stehenního svalu. (Marrs et al. 2007).

Terapii je vhodné doplnit antikonvulzivy působícími na úrovni CNS, dochází pak ke zmírnění křečí a spasmu svalů. Nejčastěji se v těchto případech používá diazepam, ale lze použít i jiné obdobně působící látky (Delfino et al. 2009).

Musíme zabránit kontaminaci zachraňujících osob během léčby a transportu pomocí ochranných obleků, vybavení individuální ochrany a kompletní dekontaminace oběti (Sidell et al. 1997).

Pokud dojde k zasažení kůže a očí NPL, je nutné co nejdříve provést dekontaminaci zasažených míst. Dekontaminaci lze provádět buď chemickou cestou (častěji), popř. lze ji provést i enzymatickou cestou. Pro dekontaminaci kůže má AČR připraven pro každého příslušníka Individuální protichemický balíček vzor 80, obsahující desprach, mikromletý bentonit (valchářskou hlinku),



pro nějž je charakteristická vysoká absorpční schopnost. V případě zasažení očí stejnou službu zajistí co nejdelší výplach očí 1 – 2 % bikarbonátem sodným, fyziologickým roztokem, borovou vodou nebo alespoň nezamořenou čistou vodou (Patočka a kol. 2004).

#### 4.7.2. Anticholinergika

Anticholinergika (funkční antidota) zabraňují navázání nahromaděného ACh na cholinergní receptory tak, že tyto receptory samy zablokují (antagonizují účinek nahromaděného ACh).

Nejvíce používané anticholinergikum je **atropin**. Je účinný při léčbě intoxikací způsobených všemi OF sloučeninami. Atropin antagonizuje účinek nahromaděného ACh především na periferních muskarinových receptorech. Málo působí na nikotinových receptorech. Slabě také ovlivňuje centrální příznaky intoxikace, neboť obtížně prochází přes hematoencefalickou bariéru (HEB).

Podáváme jej v i.m. nebo i.v. v dávce 2-4 mg opakovaně v 10-30 minutových intervalech. Pokud je to možné, je výhodné podávat atropin v infuzi. Tolerance organismu otráveného NPL je vůči atropinu tak vysoká, že prakticky není možné intoxikovaného jedince předávkovat (Patočka a kol. 2004).

V podávání atropinu pokračujeme do prvních příznaků atropinizace (rozšíření zornic – mydriáza, zčervenání kůže, suchost sliznic, tachykardie). Celková dávka atropinu může dosáhnout až 100 mg za 24 hod.

Léčbu je vhodné doplnit podáváním i jiných anticholinergik s převahou centrálního účinku. Zvláště u intoxikací somanem a sarinem je kombinování atropinu s anticholinergiky s převahou centrálního účinku užitečné (Patočka a kol. 2004).

V AČR je zaveden jako druhé anticholinergikum benaktyzin, pro nějž je charakteristický centrální antimuskarinový účinek. Na základě experimentálních výsledků se jako další vhodná anticholinergika s převahou centrálního účinku jeví biperiden nebo skopolamin (Patočka a kol. 2004).

Nevýhodou všech anticholinergik je, že nebrání inhibici AChE OF inhibitory, ale jen antagonizují účinky nahromadění ACh.

### 4.7.3. Reaktivátory AChE

Reaktivátory AChE (kauzální antidota) umožní návrat k normálnímu přenosu cholinergního nervového vzruchu reaktivací inhibované AChE. Principem reaktivace AChE je odtržení NPL od inhibované AChE (komplex NPL-AChE) přímým působením oximu. Principem reakce je nukleofilní atak oximu (oxim musí být v neionizované formě) na fosforový atom inhibované AChE.

Různé oximy se mezi sebou liší v optimální dávce pro reaktivaci, v toxicitě a efektivitě. Všechny oximy mají 3 velké nedostatky:

- Oximy jsou kvarterní amonné ionty. Jako hydrofilní sloučeniny se těžko dostávají přes HEB do CNS. Jejich koncentrace (zvláště u biskvarterních oximů) v mozku jsou jen 1-2% jejich plasmatických hladin. Mohou tak reaktivovat jen malý podíl inhibované AChE v CNS. (Petroianu et al. 2007, Lorke et al. 2008).
- Oximy nereaktivují zestárlé fosforylované enzymy. Včasná terapie tak hraje klíčovou roli pro prognózu intoxikované osoby.
- Na rozdíl od atropinu nejsou oximy účinné proti všem OF sloučeninám. Každý oxim má dobrou reaktivační schopnost jen vůči některým OF sloučeninám.

Po chemické stránce jsou oximy mono-pyridinium-mono-aldoximy (monokvarterní - pralidoxim), nebo biskvarterní bis-pyridinium-bis-aldoximy (obidoxim, methoxim), nebo bis-pyridinium-mono-aldoximy (HI-6, K sloučeniny), (Kalasz et al. 2009).

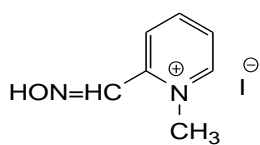
Nejběžnějšími ve světě dosud používanými reaktivátory jsou pralidoxim (2-pyridiniumaldoxim-N-methyljodid), známý též pod označením 2-PAM a obidoxim (bis-/4-pyridiniumaldoxim-N-methyl/ether dichlorid).

Ve své práci srovnávám také účinnost dalšího oximu označovaného jako HI-6. Oxim HI-6 je v současnosti nejširokospektřejší a nejúčinnější reaktivátor AChE. Jeho aplikace je účinná např. po intoxikaci sarinem, somanem, cyklosarinem, VX, ale je málo účinný na reaktivaci tabunem inhibované AChE (Kassa a kol. 2007).

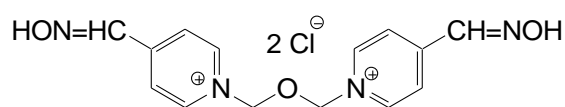
Tento oxim se ve formě hydrochloridu rozkládá ve vodném roztoku a musí být skladován jako lyofylizovaný prášek (Kassa 2002).

AČR jako jedna z mála armád na světě má k dispozici lékovou formu oximu HI-6 připravenou k použití při zasažení NPL.

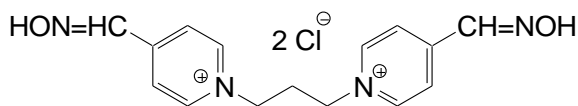
Chemickou strukturu vyjmenovaných reaktivátorů AChE znázorňuje obrázek 2.



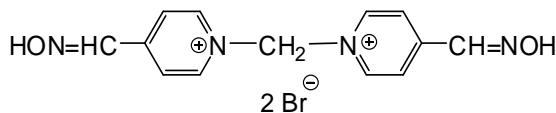
**pralidoxim**



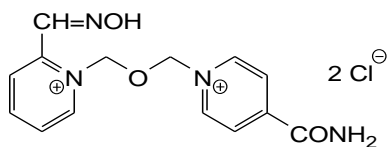
**obidoxim**



**trimedoxim**



**methoxim**



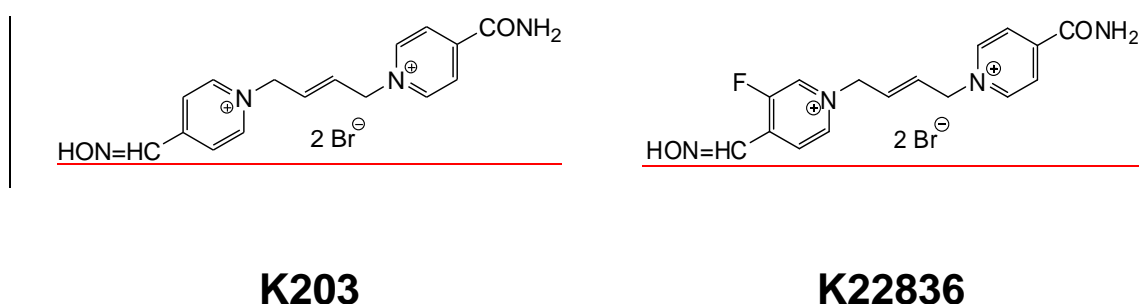
**HI-6**

Obrázek 2. Chemická struktura vybraných reaktivátorů AChE.

V mé diplomové práci hodnotím také reaktivační účinnost oximu K203 ((E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-en dibromid). Jde o nejlepší v současnosti známý reaktivátor na léčbu tabunem inhibované AChE (Kalasz et al. 2009). Tento oxim byl syntetizován na katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové (Musílek a kol. 2007).

Výše jmenované oximy porovnávám s oximem K22836, což je fluorovaný analog oximu K203. Oxim K22836 byl připraven na spolupracujícím pracovišti Research Institute of Chemical Technology (Korea). Tento oxim je díky fluorovému atomu lipofilnější než dříve zmíněné oximy a tudíž by měl lépe pronikat do CNS. Dopad zavedení fluoru do struktury tohoto oximu vzhledem k jeho reaktivační účinnosti je dosud neznámý.

Chemická struktura posledních dvou oximů je patrná z obrázku 3.



Obrázek 3.: Chemická struktura oximů K203 a K22836.

Na rozdíl od anticholinergik, jejichž opakované podávání až do příznaků atropinizace je velmi důležité, opakované podávání reaktivátorů AChE bývá zvláště u otravy NPL s rychlou dealkylací (soman) inhibované AChE diskutabilní. Ideálním testem k ověření oprávněnosti opakované terapie reaktivátory AChE je laboratorně provedený test reaktivovatelnosti erytrocytární AChE z krevního vzorku zasaženého.

## **5. MATERIÁL A METODIKA**

### **5.1. Chemikálie**

OF inhibitor tabun o čistotě ~ 98 % byl získán z institutu VTUO Brno (Česká Republika). Roztok tabunu použitého ve studii byl připravený těsně před použitím. Dávka 1 LD<sub>50</sub> byla stanovena standardním testem toxicity. Oximy (HI-6, obidoxim, trimedoxim a K203 o čistotě 97 – 99 %) byly připraveny na Katedře toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Oxim K22836 byl připraven v Research Institute of Chemical Technology, Medicinal Science Division (Daejon, Korea). Ostatní chemikálie čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika).

### **5.2. Zvířata**

Pokusy byly prováděny na samcích laboratorních potkanů kmene Wistar o váze 180-200 g (Anlab, Praha, Česká Republika). Zvířata byla udržována v klimatizované místnosti (stálá teplota  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , vlhkost  $50 \pm 10 \%$ , světelný cyklus 12 hod. světlo/ 12 hod. tma), krmena byla standardní peletovou dietou a vodou ad libitum.

Zvířata byla rozdělena do 7 skupin po 6 jedincích. Hmotnostní rozpětí jednotlivých zvířat ve skupinách nepřekročilo  $\pm 10$  g.

Experiment probíhal pod dohledem Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Personál manipulující se zvířaty byl předem proškolen a získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle §17 odst. 1 zákona č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

### 5.3. Roztoky pro biochemické stanovení

0,1M Tris pufr – zásobní roztok pro přípravu Tris pufru byl připraven rozpuštěním 24,2 g 1,1,1-tris-(dihydroxymethyl)-aminometanu ve 1000 ml destilované vody, z tohoto roztoku bylo odebráno 250 ml a doplněno na objem 950 ml destilovanou vodou, v tomto objemu bylo ustáleno pH na 7,6 pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl) a doplněna destilovaná voda na konečný objem 1000 ml.

Zásobní roztok Tritonu X-100 byl připraven tak, že k 1000 g destilované vody bylo přidáno 0,12 g Tritonu X-100.

0,02M Tris pufr – k 100 ml 0,1M Tris pufru bylo přidáno 370 ml zásobního roztoku Tritonu X-100, v tomto objemu bylo ustáleno pH na 7,6 přidáním příslušného množství zásobního roztoku pro přípravu Tris pufru, poté byl doplněn zásobní roztok Tritonu X-100 na konečný objem 500 ml. Tímto postupem byl získán 0,02M Tris pufr, který je zároveň přibližně 0,01 % roztokem Tritonu X-100.

Zásobní roztok DTNB byl připraven tak, že 0,1 g DTNB bylo rozpuštěno za stálého míchání v 100 ml 0,1M Tris pufru o pH 7,6. Tento roztok lze ke stanovení používat jen 3 dny, pokud je uchováván v lednici při teplotě +4°C a je chráněn před světlem. V čase potřeby je připravena směs zásobního roztoku DTNB a 0,1M Tris pufru v poměru 135:40 (DTNB :Tris pufr). Takto připravený roztok může být používán pouze v den přípravy, během stanovení jej chráníme před slunečními paprsky (jejich vlivem dochází ke štěpení DTNB a vzniku barevného TNB<sup>-</sup>, což zanáší chybu do následného spektrofotometrického stanovení).

### 5.4. Substrát

Pro stanovení aktivity AChE je používán specifický substrát, acetylthiocholin jodid (ATChJ). Zásobní roztok ATChJ se připraví rozpuštěním 29 mg ATChJ v 10 ml destilované vody. Takto připravený zásobní roztok je uchováván v dávkách 1 ml při teplotě -12°C. V době potřeby je obsah

mikrozkumavky roztaven a zásobní roztok je zředěn v poměru 1:10 (roztok ATChJ : destilovaná voda).

Pro stanovení aktivity BuChE je obdobným způsobem používán specifický substrát, butyrylthiocholin jodid (BuTChJ).

## **5.5. Kalibrační roztok**

Biochemické stanovení aktivit cholinesteras je kalibrováno pomocí cystein chloridu. Zásobní roztok cysteinu je připraven rozpuštěním přesného množství této látky (0,03152 g) v 200 ml destilované vody. Zásobní roztok je rozdělen na dávky 1 ml do mikrozkumavek a je skladován při teplotě -12°C až do doby, kdy je použit ke kalibraci.

## **5.6. Biochemické stanovení aktivity cholinesteras**

Aktivita AChE v plné krvi, BuChE v plasmě, AChE i BuChE v mozku a AChE v bránici byla měřena spektrofotometricky, metodou dle Ellmana (Ellman et al. 1961) za pomoci DTNB modifikovaným postupem podle Bajgara (Bajgar 1972). Pro stanovení absorbance byl použit Spektrofotometr Helios Alpha (Elektron Corporation, Oxford, Velká Británie). Byla modifikována vlnová délka na 436 nm, tak aby nedocházelo k výrazným interferencím s hemoglobinem při standardní vlnové délce 412 nm. Odebraná heparinizovaná krev byla hemolyzována v poměru 1:20 v 0,02M Tris pufru o pH 7,6. Hemolýza probíhala 4 min. před vlastním měřením. Plasma byla připravena centrifugací krve při 3000 ot./min. při 10 °C. Centrifugace probíhala 10 minut na přístroji Universal R320, Hettich, Německo. Části mozku a bránic byly homogenizovány (homogenizátor DI-25 BASIC, IKA WERKE, Německo) v 0,02M Tris pufru (v poměru 1:10) a homogenát byl použit k měření aktivity AChE. Stejným postupem byla měřena i aktivita BuChE, byl zde však použit jiný substrát (BuTChJ).

Výsledky byly vyhodnoceny v jednotkách  $\mu\text{kat/ml}$ .

## 5.7. *In vivo* experiment

Atropin v terapeutické dávce (21 mg/kg) byl i.m. aplikován v kombinaci s reaktivátorem (HI-6, trimedoxim, K203, K22836) 5 minut před vlastní intoxikací tabunem. Otravná látka v dávce odpovídající 1 LD<sub>50</sub> (180 µg/kg) byla aplikována do svalu pravého zadního stehna zvířete. Kontrolní skupině byl podán atropin a za 5 min. byl i.m. aplikován fyziologický roztok.

Zvířata byla usmrcena dekapitací 30 min. po intoxikaci tabunem, jako anestézie byl použit CO<sub>2</sub>. Po dekapitaci byla odebrána krev, mozek a bránice. Plasma byla připravena centrifugací krve při 3000 ot./min. při 10 °C. Centrifugace probíhala 10 minut na přístroji Universal R320, Hettich, Německo.

Do jednorázové plastové kyvety (V ~ 2,5 ml) bylo napipetováno 1,7 ml roztoku DTNB v 0,1M Tris pufru o pH 7,6, 100 µl krevního hemolyzátu, plasmy nebo 100 µl homogenátu tkání (mozky a bránice). Reakce byla zahájena přidáním 200 µl substrátu pro daný enzym, tzn. ATChJ pro AChE nebo BTChJ pro BuChE (výsledná koncentrace v kyvetě 10<sup>-3</sup>M) a absorbance byla měřena při 436 nm za laboratorní teploty.

Před odečtem výsledků probíhala v kyvetě reakce po dobu 4 minut, aby došlo k úplnému zreagování volných thiolů obsažených v krvi či homogenátech s DTNB, protože by mohly být naměřeny falešně pozitivní výsledky. U mozků stačilo ke zreagování volných thiolů zpoždění pouze 2 minuty, u bránic 8 minut.

## 5.8. Kalibrace

Před vlastní kalibrací je připravena cysteinová kalibrační řada. Základní roztok cysteinu je ředěn vždy v poměru 1 : 1 (koncentrovanější roztok cysteinu : destilovaná voda). Takto vznikne řada o čtyřech různých koncentracích, přičemž základní roztok je 0,2 µM.

Kalibrační řada:

0,2 µM      →    0,1 µM      →    0,05 µM      →    0,025 µM



Pro kalibraci se do kyvety místo krevního hemolýzátu nepipetuje stejný objem (0,2 ml) roztok cysteinu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DTNB v pufru a reakce se odstartuje přidáním příslušného substrátu (ATChJ). Měří se proti slepě připravenému vzorku, v něm je ATChJ (cystein) nahrazen destilovanou vodou.

## **5.9. Princip metody**

Princip této kolorimetrické metody spočívá v reakci kyseliny DTNB s SH-skupinou thiocholinu za vzniku barevné reakce. Jako substráty se používají estery thiocholinu. Při stanovení aktivity AChE se používá ATChJ, u BuChE se používá BuTChJ. Tento substrát je příslušnou esterázou (AChE, BuChE) štěpen na thiocholin a příslušnou kyselinu. SH- skupina thiocholinu se naváže na DTNB a jeho zbytek, 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina je fotometricky měřena. Výhoda této metody je specifita reakce, jednoduchost provedení a vysoká citlivost (Bajgar 1972).

## **5.10. Statistické hodnocení výsledků**

Počet zvířat ve skupině byl 6. Aktivity enzymu v krevním hemolýzátu byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka.

## 6. VÝSLEDKY

Aktivita cholinesteras (AChE i BuChE) byla měřena u sedmi skupin potkanů. První kontrolní skupině potkanů byl aplikován pouze atropin (v dávce 21 mg/kg) bez reaktivátoru AChE a po pěti minutách fyziologický roztok. Druhé kontrolní skupině potkanů byl aplikován atropin (v dávce 21 mg/kg) bez současného podání reaktivátoru AChE. Po pěti minutách ji byl aplikován tabun v dávce 1 LD<sub>50</sub> (180 µg/kg). Zbývajícím pěti skupinám potkanů byly aplikovány atropin (v dávce 21 mg/kg) a současně s ním různé reaktivátory AChE v užívané terapeutické dávce pro potkany (každá skupina potkanů dostala pouze jeden reaktivátor). Po pěti minutách byl těmto pěti skupinám potkanů aplikován tabun v dávce 1 LD<sub>50</sub> (180 µg/kg). Aktivity cholinesteras byly měřeny u všech skupin potkanů, včetně obou kontrolních skupin.

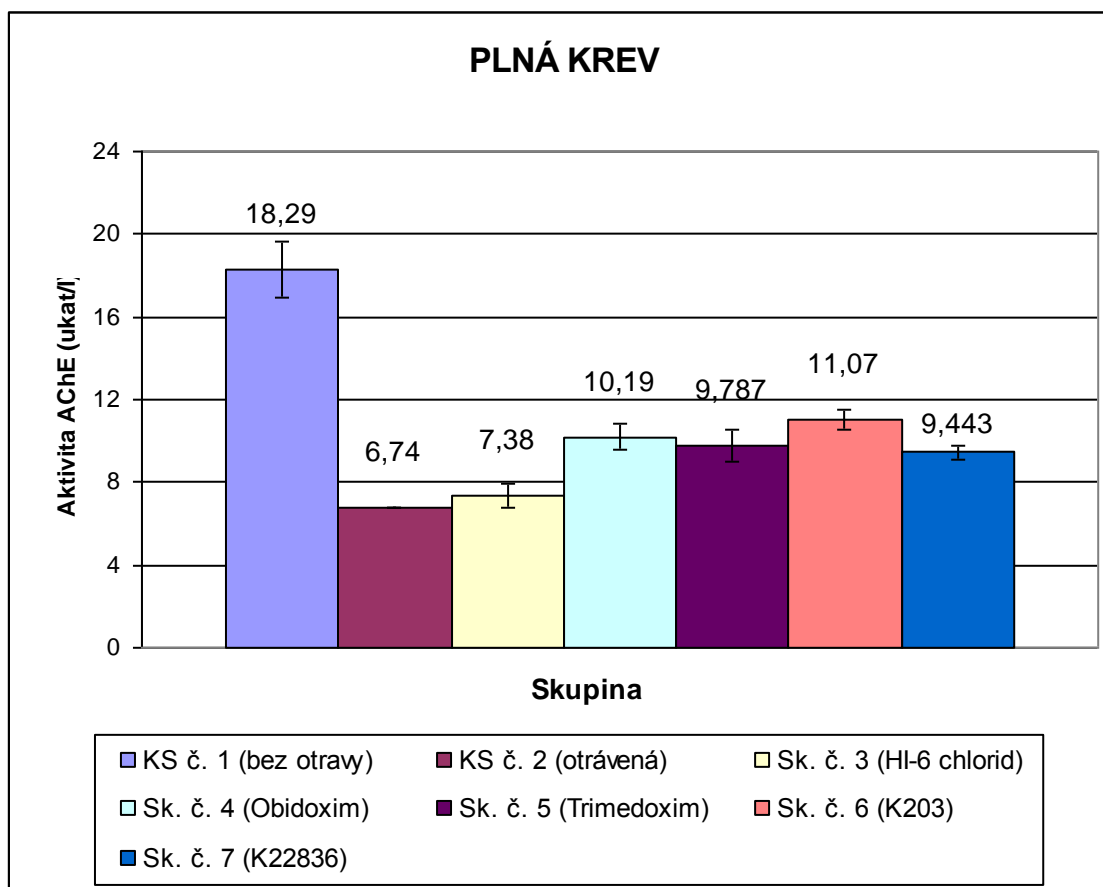
Tab. č. 1 zobrazuje přehled jednotlivých reaktivátorů AChE a aplikovaných dávek (dávky ekvimolární) u jednotlivých skupin potkanů.

**Tab. č. 1: Přehled reaktivátorů cholinesteras a jejich použitých koncentrací u jednotlivých skupin potkanů.**

Skupina	Aplikovaný oxim
Kontrolní skupina č.1	- (bez otravy)
Kontrolní skupina č.2	- (intoxikovaná)
3	HI-6 chlorid (18,9 mg/kg)
4	Obidoxim (18 mg/kg)
5	Trimedoxim (22,3 mg/kg)
6	K203 (22,9 mg/kg)
7	K22836 (23,8 mg/kg)

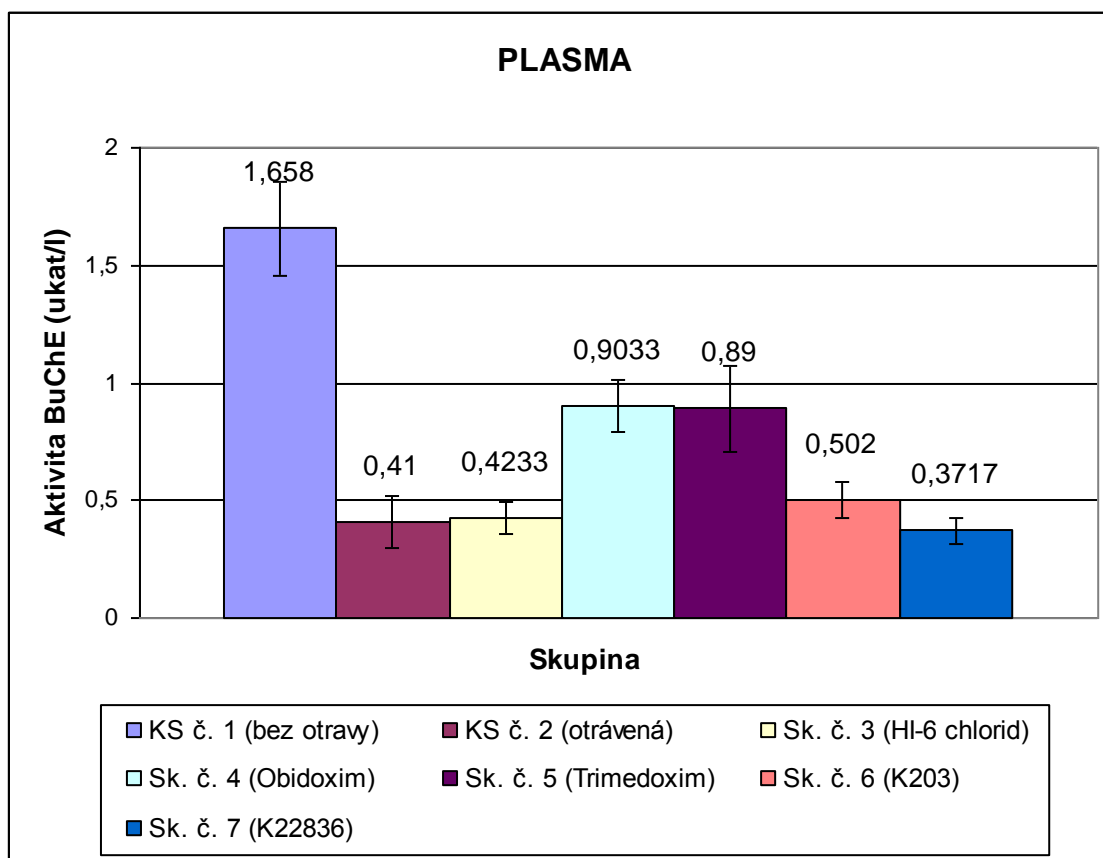
Výsledky aktivit cholinesteras v plné krvi, plasmě, mozku a bránici u jednotlivých skupin potkanů jsou znázorněny v grafech č. 1 – 5.

**Graf č. 1: Srovnání aktivit AChE v plné krvi u jednotlivých skupin potkanů.**



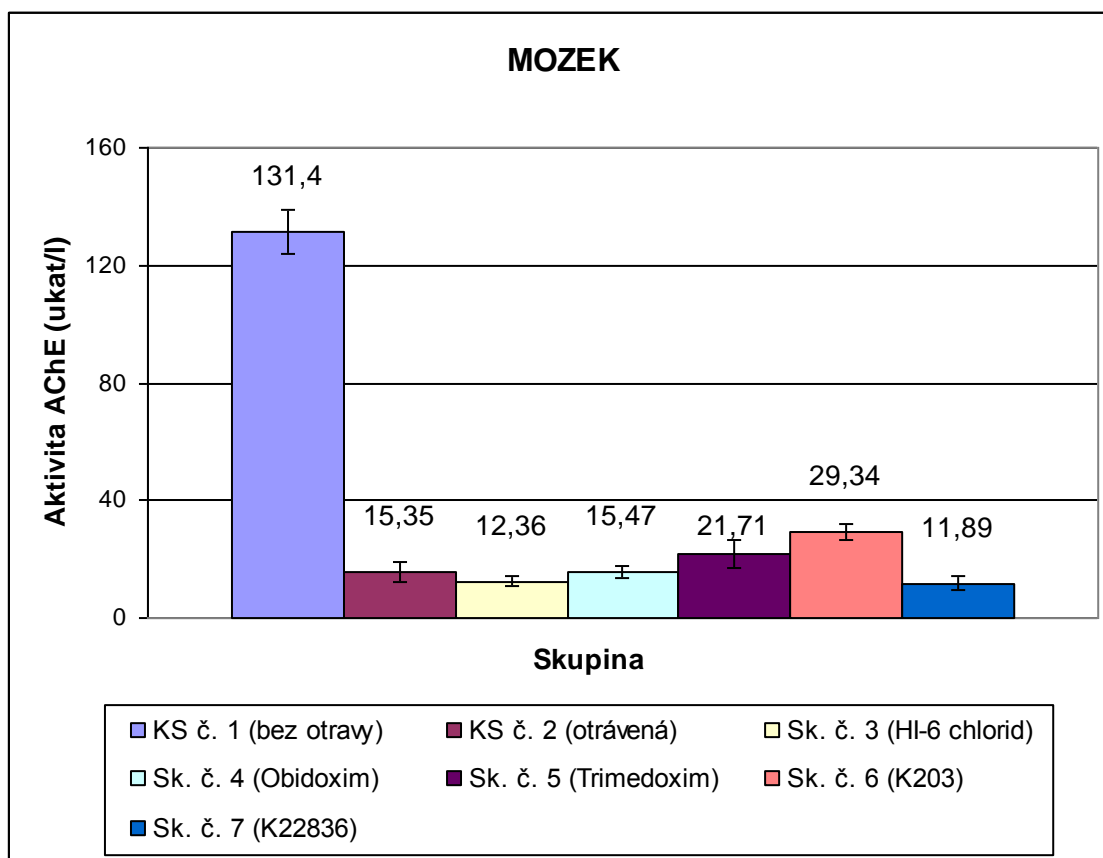
Aktivita neinhibované AChE v plné krvi měla hodnotu 18,29  $\mu\text{kat/l}$ . Inhíbovaná AChE v plné krvi byla 6,74  $\mu\text{kat/l}$  (36,9 %). Zřetelnou reaktivační účinnost měly oximy: K203 (aktivita 11,07  $\mu\text{kat/l}$ , tzn. zlepšení o 23,6 % oproti intoxikované skupině), obidoxim (aktivita 10,19  $\mu\text{kat/l}$ , tzn. zlepšení o 18,8 % oproti intoxikované skupině), trimedoxim (aktivita 9,787  $\mu\text{kat/l}$ , tzn. zlepšení o 16,6 % oproti intoxikované skupině) a K22836 (aktivita 9,443  $\mu\text{kat/l}$ , tzn. zlepšení o 14,7 % oproti intoxikované skupině). Prakticky neúčinný byl oxim HI-6 chlorid s hodnotou aktivity 7,38  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení jen o 3,4 % oproti intoxikované skupině).

**Graf č. 2: Srovnání aktivit BuChE v plasmě u jednotlivých skupin potkanů.**



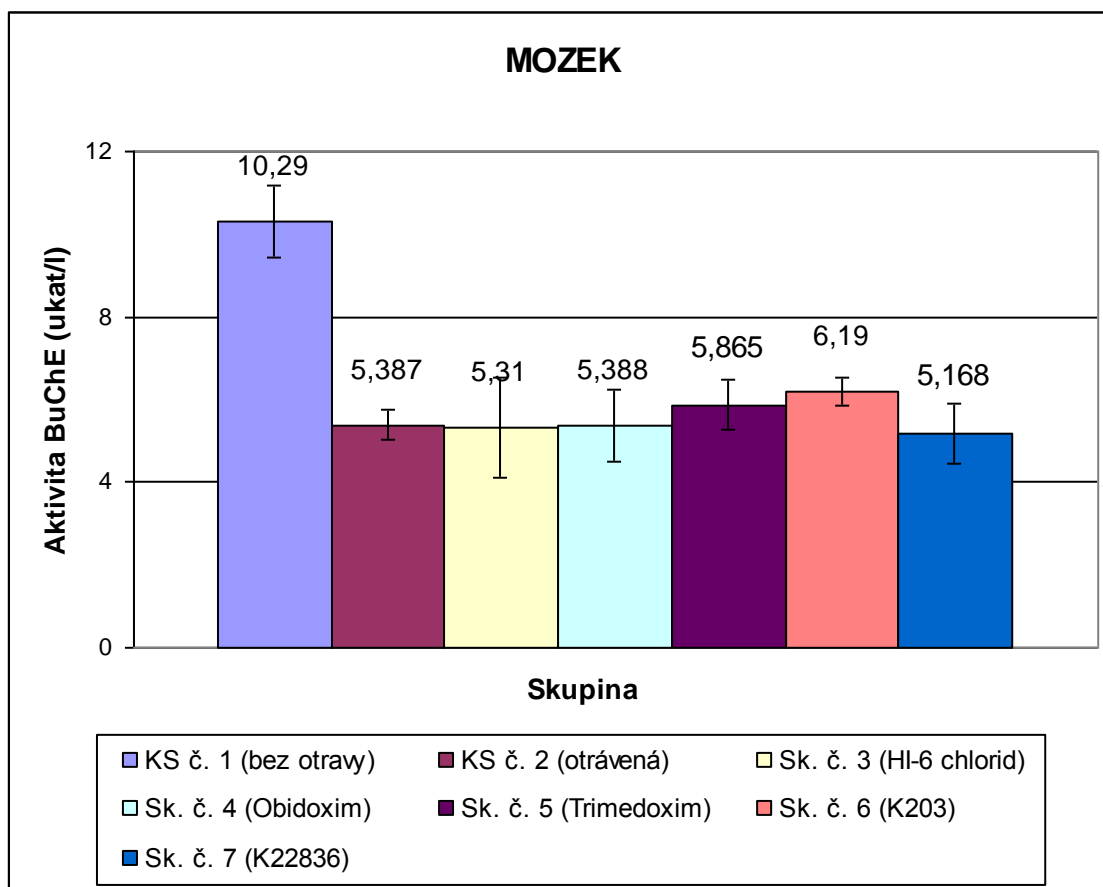
Aktivita neinhibované BuChE v plasmě činila 1,658  $\mu\text{kat/l}$ . Inhibovaná BuChE v plasmě měla hodnotu 0,41  $\mu\text{kat/l}$  (24,7 %). Signifikantně účinné byly jen: obidoxim s aktivitou 0,9033  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 29,8 % oproti intoxikované skupině) a trimedoxim s aktivitou 0,89  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 24,16 % oproti intoxikované skupině). Zbývající oximy byly prakticky neúčinné. Oxim K203 vykazoval aktivitu 0,502  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 5,6 % oproti intoxikované skupině), HI-6 chlorid vykazoval aktivitu 0,4233  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 0,8 % oproti intoxikované skupině) a K22836 měl aktivitu jen 0,3717  $\mu\text{kat/l}$ , což je dokonce méně o 2,3 % než u intoxikované skupiny.

**Graf č. 3: Srovnání aktivit AChE v mozku u jednotlivých skupin potkanů.**



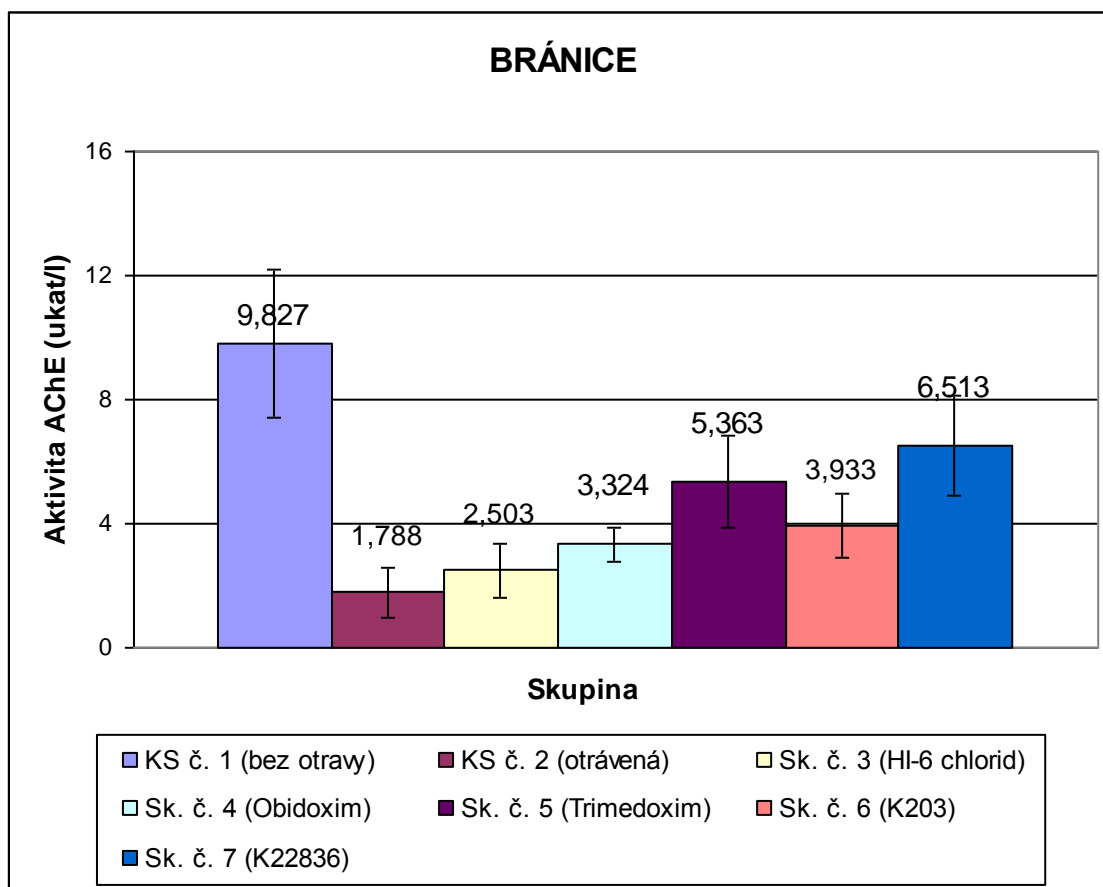
Aktivita neinhibované AChE v mozku byla 131,4  $\mu$ kat/l. Inhibovaná AChE tamtéž měla hodnotu 15,35  $\mu$ kat/l (11,7 %). Zřetelně nejúčinnější byl oxim K203 s hodnotou aktivity 29,34  $\mu$ kat/l (zlepšení o 10,6 % oproti intoxikované skupině). Jistou účinnost vykazoval i trimedoxim s hodnotou aktivity 21,71  $\mu$ kat/l (zlepšení o 4,8 % oproti intoxikované skupině). Zbývající 3 oximy: Obidoxim s hodnotou aktivity 15,47  $\mu$ kat/l (zlepšení o 0,1 % oproti intoxikované skupině), HI-6 chlorid s hodnotou aktivity 12,36  $\mu$ kat/l (zhoršení o 2,3 % oproti intoxikované skupině) a oxim K22836 s hodnotou aktivity 11,89  $\mu$ kat/l (zhoršení o 2,7 % oproti intoxikované skupině).

**Graf č. 4: Srovnání aktivit BuChE v mozku u jednotlivých skupin potkanů.**



Aktivita neinhibované BuChE v mozku byla 10,29  $\mu\text{kat/l}$ . Inhibovaná BuChE tamtéž měla hodnotu 5,387  $\mu\text{kat/l}$  (52,4 %). Nejúčinnější byl oxim K203 s hodnotou aktivity 6,19  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 7,8 % oproti intoxikované skupině). Za ním následoval trimedoxim s hodnotou aktivity 5,865  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 4,6 % oproti intoxikované skupině). Zbývající tři oximy byly neúčinné: Obidoxim s hodnotou aktivity 5,388  $\mu\text{kat/l}$  (stejně jako intoxikovaná skupina), HI-6 chlorid s hodnotou aktivity 5,31  $\mu\text{kat/l}$  (zhoršení o 0,8 % oproti intoxikované skupině) a oxim K22836 s nejnižší hodnotou aktivity 5,168  $\mu\text{kat/l}$  (zhoršení o 2,2 % oproti intoxikované skupině).

**Graf č. 5: Srovnání aktivit AChE v bránici u jednotlivých skupin potkanů.**



Aktivita neinhibované AChE v bránici byla 9,827  $\mu\text{kat/l}$ . Inhibovaná AChE v bránici měla hodnotu 1,788  $\mu\text{kat/l}$  (18,2 %). Nejúčinnější byl oxim K22836 s hodnotou aktivity 6,513  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 48,3 % oproti intoxikované skupině). Pak následoval trimedoxim s hodnotou aktivity 5,363  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 36,4 % oproti intoxikované skupině). Třetí nejefektivnější byl oxim K203 s hodnotou aktivity 3,933  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 21,8 % oproti intoxikované skupině). Poté následoval obidoxim s hodnotou aktivity 3,324  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 15,6 % oproti intoxikované skupině). Nejméně účinným byl HI-6 chlorid s hodnotou aktivity 2,503  $\mu\text{kat/l}$  (zlepšení o 7,3 % oproti intoxikované skupině).

## 7. DISKUSE

Většina NPL, jsou vysoce lipofilní látky. Absorbují se rychle všemi cestami podání a inhibují také AChE v mozku, neboť k mozku jako lipofilní struktuře mají velmi vysokou afinitu (Anderson et al. 1992, Bajgar 1992, Bajgar 1991b). Tato skutečnost je dobře patrná z grafu č.3, kde došlo k výrazné inhibici AChE v mozku u experimentálních zvířat. Inhibovaná AChE měla jen přibližně 10 % své původní aktivity, což by v takovém případě bez následné terapie vedlo ke smrti dané skupiny zvířat (Karasová J. a kol. 2009).

Experimentálně bylo zjištěno, že jen přibližně 1-3 % podané dávky NPL inhibuje AChE v mozku. Tento fakt způsobuje hlavní toxický efekt těchto látek (Bajgar 1991b, Kadar et al. 1985, Little et al. 1988, Shapira et al. 1990).

Díky inhibici AChE a dalších enzymů v mozku NPL zasahují do cholinergní nervové transmise. Dochází ke změnám v hladinách neurotransmiterů, a to ACh a katecholaminů. ACh působí také jako agonista při uvolnění histaminu. NPL tak mohou dodatečným uvolněním histaminu zvětšit vyvolaný bronchiální spasmus (Cowan et al. 1996).

Dále dochází ke změnám v membránové propustnosti (Bajgar 1992, Kassa 1998) a v mozkovém energetickém metabolismu. Zvýšení depolarizace vyvolává velké zvýšení hladiny ATP (Gupta et al. 2001). To může mít vliv na permeabilitu HEB a poškodit mozek dalšími toxickými látkami nebo terapeutiky. Také oxidativní metabolismus (lipidová peroxidace) bývá narušen v obou mozkových hemisférách.

Křeče vyvolané NPL mohou také posílit další excitační neurotransmisní systém (uvolnění dodatečného množství glutamátu a ovlivnění jeho přenašečů). Ztráta inhibiční kontroly může být odpovědná za udržování těchto křečí a za tvorbu následných poškození mozku (Shih et al. 1991). Může dojít ke smrti neuronů na základě aktivace NMDA receptorů, akumulaci vápníku, přeuspořádání buněčné aktivity a aktivaci katabolických enzymů (Solberg and Belkin 1997).

NPL mohou také vyvolat imunologické změny a anafylaktickou reakci (Bajgar 1992, Bajgar 1991b, Bardin et al. 1994, Cowan et al. 1996, Kassa 1998).



Oximy ve své molekule obsahují vždy alespoň jeden kvarterní dusík na pyridinovém kruhu. Jsou tedy velice polární a dle základního farmakologického pravidla by neměly volně difundovat přes HEB do mozku. Proto nepřekvapí, že diskuse o průchodu oximů do mozku a možnosti reaktivace AChE v CNS probíhají od objevu pralidoximu, reaktivujícího AChE, tedy od poloviny 50-tých let. I v současnosti jsou stále neuspokojivé terapeutické výsledky léčby reaktivátory AChE, pokud sledujeme úpravu projevů neurotoxicity po intoxikaci NPL (Aas and Jacobsen 2005).

Současná data indikují, že oximy i přesto že jsou silně hydrofilní jsou schopny vstoupit do CNS. Koncentraci v mozku ale odpovídá jen asi na 4-10 % plasmatické hladiny, pokud jsou podány vysoké – tedy neterapeutické dávky. V současnosti je diskutováno zda je průchod přes HEB zprostředkován přenašečem, pravděpodobně jedním z přenašečů pro aminokyseliny (Lorke et al. 2008).

Při vyhodnocení reaktivační účinnosti jednotlivých oximů v této diplomové práci je z výsledků patrné, že míra reaktivace inhibovaných enzymů (AChE i BuChE) v mozku je velice nízká. Míra reaktivace v mozku je pro oba enzymy (AChE i BuChE) velice podobná.

Z grafu č. 3 je zřetelně patrné, že signifikantní terapeutické zlepšení přinesl pouze oxim K203 (o 10,6 %). Jestliže reaktivace inhibované AChE je značná, tzn. zvýšení v reaktivaci o více než 10 %, může dojít k záchraně života intoxikovaného organismu a snížit toxické symptomy vyvolané danou NPL (Karasová J. a kol. 2009a).

Z literárních zdrojů (Karasová J. a kol. 2009b) i z grafů č. 1 a 2 můžeme vidět, že u oximu K22836 došlo ke snížení reaktivační účinnosti na periferii vzhledem k oximu K203.

Zbývajících čtyři oximy nepřinesly zřetelně patrné zvýšení aktivity inhibované mozkové AChE. Námi sledovaný oxim K22836 byl nejhorší ze všech pěti porovnávaných oximů. Jeho použití nevedlo k žádnému zvýšení aktivity mozkové AChE u intoxikovaných zvířat. Toto dokazuje, že zavedení fluoru do struktury reaktivátoru AChE není řešením ve zvýšení prostupu těchto kvarterních látek přes HEB. Tuto skutečnost dokládá i graf č. 4, z něhož je patrné, že došlo i u mozkové BuChE ke stejným výsledkům jako v případě mozkové AChE.

Z grafu č. 1 je patrné, že nejlepší byl opět jako v případě mozkové AChE i BuChE oxim K203, který zlepšil aktivitu inhibované AChE v plné krvi u intoxikovaných zvířat skoro o 24 %.

V plasmě efektivně působily jen oximy obidoxim a trimedoxim. Zbývající tři oximy (včetně námi sledovaného oximu K22836) nepřinesly prakticky žádné zlepšení aktivity inhibované BuChE v plasmě u intoxikovaných zvířat.

Námi sledovaný oxim K22836 přinesl nejvyšší zvýšení aktivity inhibované AChE v bránici ze všech pěti oximů (téměř o 50 %). Zároveň je však z grafu č. 5 patrné, že u měření aktivity AChE v bránici dochází při vyhodnocování výsledků k velmi výrazným odchylkám při jednotlivých měřeních. Z grafu č.5 patrné výrazné zvýšení aktivity inhibované AChE v bránici oximem K22836 tak může být způsobené jen náhodnou chybou při měření.

Z výsledků je tedy zřetelně patrné, že nově připravený oxim K22836, jenž by díky fluoraci zvýšené lipofilitě měl snadněji pronikat do CNS, je v CNS neúčinný reaktivátor vůči tabunem inhibované cholinesterase. Nejlepších výsledků na úrovni CNS při reaktivaci tabunem inhibovaných cholinesteras dosáhl oxim K203. Tento nefluorovaný analog našeho zkoumaného oximu K22836 tak zůstává stále nejlepším reaktivátorem na léčbu tabunem inhibovaných cholinesteras.

Aby mohly reaktivátory cholinesteras lépe působit na inhibované enzymy v mozku, je možné vyzkoušet některé postupy (metody) ke zlepšení jejich průniku přes HEB z periferního oběhu do CNS. Níže jsou vyjmenované některé postupy, které by mohly požadované zlepšení přinést.

Jedním ze způsobů zlepšení průniku reaktivátorů cholinesteras by mohla být tzv. *mikroenkapsulace*. Tato technika spočívá v obalení požadované látky (v našem případě požadovaný reaktivátor) do mikrokapičky (1 – 2  $\mu\text{m}$  velké) v obalu s lipidovou nebo proteolipidovou povahou, jenž by mohlo usnadnit průnik polárních částic přes HEB, popř. by také mohlo stabilizovat nestálé látky v prostředí organismu.

Ke zlepšení průniku reaktivátorů cholinesteras do mozku bychom mohli také použít urychlovače průniku látek přes biologické membrány (tzv. *penetration enhancers*), jenž se používají cíleně ke zvýšení specifického účinku léčiv, resp. ke zlepšení dopravy k cílovým orgánům.

Další metodou ke zvýšení průniku reaktivátorů cholinesteras do CNS by mohlo být jejich navázání na D-glukosu. Tato látka slouží jako zdroj energie pro mozek a je transportována z krve do CNS pomocí přenašeče GLUT1. Je to Na<sup>+</sup> nezávislý facilitovaný transportér hexozového uspořádání, umístěný na lumenální a ablumenální straně HEB (Tsuji 2005, Cornford and Hyman 2005, Ohtsuki and Terasaki 2007).

Zlepšením průniku reaktivátorů cholinesteras přes HEB do CNS by též mohlo být navázání těchto látek na aminokyseliny. Ty jsou do mozku dopravovány prostřednictvím AK transportéru 1 (LAT1, systém L) pro L-tyrozin, L-tryptofan, L-histidin (prekurzory pro neurotransmitery) a L-leucin, L-isoleucin a L-valin (substráty pro syntézu proteinů) (23,24). Dalším transportním systémem je kationický AK transportér CAT1 (systém y<sup>+</sup>).

Reaktivátory cholinesteras by se daly dopravit do mozku i prostřednictvím vazby na hormony. Např. thyroïdní hormony se přes HEB dopravují prostřednictvím organického anionického transportního systému OAT (Ohtsuki and Terasaki 2007).

## 8. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo porovnat reaktivační účinnost fluorovaného oximového reaktivátoru AChE K22836 s dalšími běžně používanými oximovými reaktivátory AChE (např.: HI-6, obidoxim, trimedoxim) a nově syntetizovaným oximem K203, což je nefluorovaný analog oximového reaktivátoru K22836. Dále jsme se snažili zjistit jeho terapeutické možnosti v CNS srovnáním se standardně používanými nefluorovanými oximovými reaktivátory AChE ve snaze nalézt účinnější antidotum, které by lépe pronikalo do CNS.

Experiment prokázal slabou reaktivační účinnost fluorovaného oximového reaktivátoru AChE K22836 ve srovnání s dalšími běžně používanými oximovými reaktivátory AChE při intoxikaci tabunem *in vivo*. Náš fluorovaný oximový reaktivátor K22836 byl při reaktivaci inhibovaných cholinesteras v CNS naprosto neúčinný. Zavedení atomu fluoru do oximového relativně účinného reaktivátoru K203 se tedy neosvědčilo.

Doporučujeme do budoucna zvolit jinou možnost úpravy oximu K203, popřípadě zvolit jiný postup, jak doručit tento oxim přes HEB do CNS.

## 9. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Ing. Pavel Jurczyk

Školitel: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Název diplomové práce: **Studium změny reaktivační účinnosti a možnosti prostupu přes hematoencefalickou bariéru po zavedení fluoru do struktury oximového reaktivátoru acetylcholinesterasy**

Cílem našeho experimentu bylo zjistit, zda zavedení atomu fluoru do oximového relativně účinného reaktivátoru K203 zlepší jeho prostup do mozku, a tím zvýší jeho reaktivační účinnost v CNS oproti standardně používaným nefluorovaným oximovým reaktivátorům AChE při intoxikaci tabunem *in vivo*.

Pokusy byly prováděny na samcích laboratorních potkanů kmene Wistar. Potkanům byl i.m. aplikován atropin v dávce (21 mg/kg) v kombinaci s reaktivátorem 5 minut před vlastní intoxikací tabunem v dávce odpovídající 1 LD<sub>50</sub> (180 µg/kg). Zvířata byla usmrcena dekapitací 30 min. po intoxikaci. Po dekapitaci byla odebrána krev, mozek a bránice. Plasma byla připravena centrifugací krve při 3000 ot./min. při 10 °C.

Aktivita AChE i BuChE byla měřena spektrofotometricky, metodou dle Ellmana (Ellman et al. 1961) za pomoci DTNB modifikovaným postupem podle Bajgara (Bajgar 1972).

Experiment prokázal slabou reaktivační účinnost fluorovaného oximového reaktivátoru AChE K22836 ve srovnání s dalšími běžně používanými oximovými reaktivátory AChE při intoxikaci tabunem *in vivo*. Fluorovaný oximový reaktivátor AChE oxim K22836 byl při reaktivaci inhibovaných cholinesteras v CNS naprosto neúčinný. Zavedení atomu fluoru do oximového relativně účinného reaktivátoru K203 se tedy neosvědčilo.

Doporučujeme do budoucna zvolit jinou možnost úpravy oximu K203, popřípadě zvolit jiný postup, jak doručit tento oxim přes HEB do CNS.

## 10. ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Ing. Pavel Jurczyk

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Title of diploma thesis: **Study of change of reactivation potency and also ability of penetration through the blood-brain barrier of newly prepared (fluorinated) acetylcholinesterase reactivator**

The purpose of our experiment was to find that introduction of Fluor atom to the reactivator structure leads to higher potency of reactivation action or improved the ability to permeate into the brain. The higher concentration of effective oxime in the brain may lead to an increase of reactivation efficacy in the central nervous system. We compare the therapeutic potency of this compound against commonly used not fluorinated oxime reactivators acetylcholinesterase by intoxication with tabun *in vivo*.

Experiments were performed on male of laboratory Wistar rats. Atropine in the dose (21 mg/kg) in combination with reactivator 5 minutes before intoxication (1 LD<sub>50</sub>; 180 µg/kg) were applied intramuscularly. Thirty minutes after intoxications animals were killed in CO<sub>2</sub> atmosphere and took up their blood, brain and diaphragm. The plasma was prepared by centrifugation of the blood at 3000 ot./min. by 10 °C.

The activity AChE and BuChE were measured spectrophotometrically by Ellman method (Ellman et al. 1961) with use DTNB by modified method according to Bajgar (Bajgar 1972).

The experiment demonstrated weak reactivation efficacy of fluorinated oxime acetylcholinesterase reactivator K22836 in comparison with other commonly used oxime acetylcholinesterase reactivators in peripheral compartment. Fluorinated oxime K22836 was not able to reactivate inhibited AChE in the central nervous system. The introduction of Fluor atom to the oxime depressed the therapeutic potency of oxime K203 – this change in structure is not convenient.

We recommend for the future choose another possibility of change of oxime K203 structure, or select other method to deliver this oxime through the blood brain barrier into the central nervous system.

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

Aas P. and Jacobsen D. (2005) Nerve gas--guidelines for care of victims of terrorism. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 125, 731-735

Anderson D.R., Harris L.W., Woodard C.L. and Lennox W.I. (1992) The effect of pyridostigmine pretreatment on oxime efficacy against intoxication by soman and VX in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 15, 285-294

Bajgar J. (2006) Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti, 1. vyd. Nucleus HK, Hradec Králové, 182 stran.

Bajgar J. (1992) Biological monitoring of exposure to nerve agents. *Brit. J. Ind. Med.* 49, 648-653

Bajgar J., Fusek J. a Hrdina V. (1991a) *Vojenská toxikologie. Učební texty VLA JEP Hradec Králové, Hradec Králové sv. 260, 266 stran.*

Bajgar J. (1991b) The influence of inhibitors and other factors on cholinesterases. *Sbor. Ved. Pr. LFUK Hradec Králové* 34, 3-75

Bajgar J. (1972) Determination of acetylcholinesterase activity in human blood-possible modification for field conditions (in Czech), *Voj. Zdrav. Listy*, vol. 41, 78-80

Bardin P.G., van Eeden S.F., Moolman J.A., Foden A.P. and Joubert J.R. (1994) Organophosphate and carbamate poisoning. *Arch. Intern. Med.* 154, 1433-1441

Benschop H.P. and De Jong L.P.A. (1988) Nerve agent stereoisomers: Analysis, isolation, and toxicology. *Acc. Chem. Res.* 21, 368-374

Cannard K (2006) The acute treatment of nerve agent exposure. *J. Neurol. Sci.* 249, 86-94

Cornford E.M. and Hyman S. (2005) Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx* 2, 27-43

Cowan F.M., Shih T.M., Lenz D.E., Madsen J.M. and Broomfield C.A. (1996) Hypothesis for synergistic toxicity of organophosphorus poisoning-induced cholinergic crisis and anaphylactoid reactions. *J. Appl. Toxicol.* 16, 25-33

Curtis C. and Mason P. (1993) Aging of cholinesterase after inhibition by organophosphates. *Ann. Pharm. Fr.* 51, 63-77

Delfino R.T., Ribeiro T.S. and Figueroa-Villar J.D. (2009) Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* 00, 1-22

Doctor B.P. and Saxena A. (2005) Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 157-158, 167-171

Dunn M.A., Hackley B.E. and Sidell F.R. (1997) In: Medical aspects of chemical and biological warfare-textbook of Military Medicine. Sidell F.R., Takafuji E.T., Franz D.R. (eds.) Office of the Surgeon General, US Army, Washington D. C. ,pp. 181-196.

Eckert S., Eyer P., Muckter H. and Worek F. (2006) Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* 72, 344-357

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr. and Feather-Stone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95



Ekstrom F., Pang Y.P., Boman M., Artursson E., Akfur C. and Borjegen S. (2006) Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, ortho-7 and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem. Pharmacol.* 72, 597-607

Eyer P. (2003) The role of oximes in the management of organophosphorous pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 165-190

Gupta R.C. (2006) In: *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. Gupta R.C. (ed.) 1<sup>st</sup> ed. Elsevier Academic Press, London, pp. 5-24.

Gupta R.C., Milatovic D. and Dettbarn W.D. (2001) Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: Protection by antioxidants. *Neurotoxicology* 22, 271-282

Jokanovic M. (2001) Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 166, 139-160

Kadar T., Raveh L., Cohen G., Oz N., Baraness I., Balan A., Ashani Y. and Shapira S. (1985) Distribution of 3H-soman in mice. *Arch. Toxicol.* L 58, 45-49

Kalasz H., Furesz J. and Tekes K. (2009) Monitoring the pharmacokinetics of pyridinium aldoximes in the body. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 596-610

Karasova J., Kassa J., Musilek K., Pohanka M., Novotny L. and Kuca K. (2009a) Effect of seven newly synthesized and currently available oxime cholinesterase reactivators on cyclosarin-intoxicated rats. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3065-3075

Karasová J., Kassa J., Musílek K., Jung Y.S. a Kuča K. (2009b) Je fluorace oximů tou správnou cestou k zvýšení průniku těchto látek do centrálního nervového systému? *Voj. Zdrav. Listy* 1, 23-27

Kassa J, Kuča K., Karasová J. a Musílek K. (2008) The development of new oximes and the evaluation of their reactivating, therapeutic and neuroprotective efficacy against tabun. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 1134-1143

Kassa J., Jun D. and Kuca K. (2007) A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in cyclosarin-and tabun-poisoned rats. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22, 297-300

Kassa J. (2003) Základy vojenské toxikologie a ochrany proti bojovým chemickým látkám role 1-4, Učební texty, VLA JEP Hradec Králové, sv. 335, 38 stran.

Kassa J. (2002) Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40, 803-816

Kassa J., Vachek J., Bajgar J. and Fusek J. (2001) A combination of pyridostigmine with anticholinergic drugs: effective pharmacological pretreatment of soman-poisoned mice. *ASA Newslett.* 84, 16-19

Kassa J. (1998) Non-specific effects of organophosphorus inhibitors of cholinesterases. *Voj. Zdrav. Listy* 67, 15-19

Kassa J., Cabal J., Bajgar J. and Szinicz L. (1997) The choice: HI-6, pralidoxime or obidoxime against nerve agents? *ASA Newslett.* 97-4, 16-18

Lincová D. a Farghali H. (eds.) (2007) Základní a aplikovaná farmakologie, 2. doplněné a přepracované vydání. Galén, Praha, 672 stran.

Little P.J., Scimeca J.A. and Martin B.R. (1988) Distribution of <sup>3</sup>H/diisopropylfluorophosphate, <sup>3</sup>H/soman, <sup>3</sup>H/sarin, and their metabolites in mouse brain. *Drug Metab. Disp.* 16, 515-520

Lorke D.E., Kalasz H., Petroianu G.A. and Tekes K. (2008) Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.* 15, 743-753

Marrs T.C. (2007) In: *Chemical warfare agents – toxicology and treatment*. Marrs T.C., Maynard R.L., Sidell F.R. (eds.) 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, pp. 191-221.

Marrs T.C. (1993) Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.* 58, 51-66

Maxwell D.M., Brecht K.M., Koplovitz I. and Sweeney R.E. (2006) Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds? *Arch. Toxicol.* 80, 756-760

Moretto A. (1998) Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicol. Lett.* 102-103, 509-513

Musílek K., Jun D., Cabal J., Kassa J., Gunn-Moore F. and Kuča K. (2007) Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase--synthesis and evaluation of (E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). *J. Med. Chem.* 22, 5514-18

Ohtsuki S. and Terasaki T. (2007) Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* 24, 1745-1758

Ordentlich A., Barak D., Sod-Moriah G., Kaplan D., Mizhari D., Segall Y., Kronman C., Karton Y., Lazar A., Marcus D., Velan B and Shafferman A. (2004) Stereoselectivity toward VX is determined by interactions with residues of the acyl pocket as well as of the peripheral anionic site of AChE. *Biochemistry* 43, 11255-11265

Patočka J. a kol. (2004) *Vojenská toxikologie*, 1. vyd. Grada Publishing, Praha, 178 stran.

Petroianu G.A., Lorke D.E., Hasan M.Y., Adem A., Sheen R., Nurulain S.M. and Kalasz H. (2007) Paraoxon has only a minimal effect on pralidoxime brain concentration in rats. *J. Appl. Toxicol.* 27, 350-357

Prymula R. a kol. (2002) *Biologický a chemický terorismus*, Grada Publishing, Praha.

Quinn D.M. (1987) p-Nitrophenyl and cholesteryl-N-alkyl carbamates as inhibitors of cholesterol esterase. *J. Biol. Chem.* 262, 260-264

Rafai M.A., Boulaajaj F.Z., Bourezgui M., Charra B., Otmani H.E., Benslama A., Motaouakkil S. and Slassi I. (2007) Clinical and electrophysiological aspects of acute organophosphate intoxication. *Neurophysiol. Clin.* 37, 35-39

Shapira S., Kadar T., Cohen G., Chapman S. and Raveh L. (1990) Effects of CBDP and MEPQ on the toxicity and distribution of <sup>3</sup>H/soman in mice. *Arch. Toxicol.* 64, 663-668

Shih T.M., Koviak T.A. and Capacio B.R. (1991) Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman-Pharmacological mechanisms. *Neurosci. Behav. Rev.* 15, 349-362

Sidell F.R. (1997) In: *Medical aspects of chemical and biological warfare – textbook of Military Medicine*. Sidell F.R, Takafuji E.T., Franz D.R. (eds.) Office of the Surgeon General, US Army, Washington D.C., pp. 129-179.

Solberg Y. and Belkin M. (1997) The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. *TIPS* 18, 183-185

Tang J., Rose R.L. and Chambers J.E. (2006) In: Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. Gupta R.C. (ed.) 1st ed. Elsevier Academic Press, London, pp. 127-143.

Tsuji A. (2005) Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems. *NeuroRx* 2, 54-62

Vellom D.C., Radic Z., Li Y., Pickering N.A., Camp S. and Tailor P. (1993) Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* 32, 12074-12084

Wang J., Gu J. and Leszczynski J. (2008) Theoretical modeling study for the phosphorylation mechanisms of the catalytic triad of acetylcholinesterase by sarin. *J. Phys. Chem. B.* 112, 3485-3494

Worek F., Koller M., Thiermann H. and Szinicz L. (2005) Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology*. 214, 182-189

Worek F., Thiermann H., Szinicz L. and Eyer P. (2004) Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237-2248